

食蟹猴 SPF 种群建立过程中病毒抗体的动态监测

王宏^{1,3}, 韦秋奖^{1,2}

(1. 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650550; 2. 昆明亚灵生物科技有限公司, 昆明 650550;
3. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 调查从老挝引种的食蟹猴 BV、SRV、SIV 和 STLV-1 四项病毒抗体阳性、可疑的比例, 并对 SPF 种群建立过程中四项病毒动态变化进行了监测, 进而比较普通种群和 SPF 种群幼猴病毒抗体的阳性率。**方法** 采用专用试剂盒对四项病毒进行连续监测并进行比较分析。**结果** 引种的 1998 只食蟹猴, BV 抗体阳性比例高达 52.35%, 可疑比例为 8.31%, 抗体阴性的比例仅为 39.34%; SRV 和 STLV-1 抗体阳性率分别为 7.45% 和 8.56%; 未检测出 SIV 抗体阳性或可疑的食蟹猴。经过筛选后组建的 SPF 种群, 2010 年监测的 BV、SRV 和 STLV-1 三项病毒抗体阳性率分别为 5.24%、1.01% 和 0.4%, 经过连续 5 年的不断筛选和淘汰, 截至 2014 年年底三种病毒抗体阳性率分别下降至 0.82%、0.27% 和 0.27%, 未检测出 SIV 抗体阳性或可疑的食蟹猴。普通群繁殖幼猴 B 病毒抗体阳性的比例为 9.71%, 可疑率为 1.85%; 而 SPF 繁殖种群 B 病毒抗体阳性率仅为 0.22%。**结论** 连续监测病毒抗体并不断淘汰抗体阳性和可疑的动物对组建 SPF 食蟹猴种群具有重要的生产意义。

【关键词】 食蟹猴; SPF 种群; BV 抗体; SRV 抗体; STLV-1 抗体; SIV 抗体; 抗体监测

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0573-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.005

Dynamic monitoring of virus antibody during the establishment of SPF cynomolgus monkey population

WANG Hong^{1,3}, WEI Qiu-jiang^{1,2}

(1. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650550, China;

2. Kunming Biomed International, Kunming 650550;

3. Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To investigate the positive and suspicious rates of BV, SRV, SIV and STLV-1 antibody of the cynomolgus monkeys introduced from Laos, dynamic monitoring of virus antibody during the establishment of SPF cynomolgus monkey population, and then comparing the positive rate of virus antibody in the baby monkeys between the common with SPF populations. **Methods** Continuous monitoring four kinds of virus in the monkeys was carried out using special reagent kits and analyzed the data. **Results** In the introduced cynomolgus monkeys (n = 1998), the positive rate of BV antibody was 52.35%, suspicious rate of BV antibody was 8.31%, and negative rate of BV antibody was only 39.34%, the positive rates of SRV and STLV-1 antibody were 7.45% and 8.56%, respectively, and positive or suspicious SIV antibody in the cynomolgus monkeys was not detected. After screening and establishment of the SPF population, the positive rates of BV, SRV and STLV-1 antibody were 5.24%, 1.01% and 0.4%, respectively, in the year 2010. Then after five years of screening and elimination, by the end of 2014, the positive rates of BV, SRV and STLV-1 antibodies were 0.82%, 0.27% and 0.27%, respectively, and positive or suspicious SIV antibody in the cynomolgus monkeys was not detected. The BV antibody positive rate of the baby monkeys was 9.71% and the suspicious rate was 1.85% in the common

【基金项目】 云南省技术创新人才项目(编号:2014HB090); 昆明市科技计划项目(编号:2014-04-A-S-02-3074); 云南省技术创新项目(编号:2015XA33)。

【通讯作者】 王宏(1975-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物学与人类疾病动物模型研究。Email: wangh@kbimed.com

population, but only 0.22% of the baby monkeys in the SPF population. **Conclusions** Continuous monitoring virus antibodies and eliminating positive and suspicious animals have important significance in the establishment of a SPF cynomolgus monkey population.

【Key words】 Cynomolgus monkey; SPF population; BV antibody; SRV antibody; STLTV-1 antibody; SIV antibody; Antibody monitoring

非人灵长类动物是人类的近亲,与人的遗传相似性极高,具有许多与人类类似的生物学和行为学特征,在组织结构、生殖生理学、解剖学上与人类高度相似^[1,2]。近年来,随着生命科学的快速发展,对非人灵长类动物的需求一直在持续增加,扩大非人灵长类动物种群数量,获得高质量、标准化的非人灵长类实验动物已成为我国科学研究进一步发展的迫切需求。目前,国际上对 SPF (specific pathogen free) 级猕猴的定义主要是指动物体内不含猴 B 病毒(cercopithecine herpesvirus type I, BV),猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV),猴 T 细胞趋向性病毒 I 型(simian T lymphotropic virus type I, STLTV-1),猴逆转 D 型病毒(simian retrovirus, SRV)和猴痘病毒(simian pox virus, SPV)等几种特定病毒的猕猴。由于非人灵长类动物可能会自然携带或感染多种病毒,因此在建立 SPF 种群的过程中对病毒抗体的监测就显得极其重要,并直接影响建群的成功率。本研究对昆明某猴场的食蟹猴进行了长期、大规模的病毒监测,在此基础上不断地筛选和剔除病毒抗体阳性和可疑的动物,从而稳定 SPF 种群的建立,进一步促进我国 SPF 级非人灵长类实验动物事业的发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物及样本收集

供试食蟹猴于 2009 年均从老挝引种至昆明亚灵生物科技有限公司【SCXK(滇)2010-0001】。其中雄性食蟹猴 998 只,雌性食蟹猴 1000 只,年龄均在 3~5 岁之间。2009 年 SPF 食蟹猴初始种群建立时,对 BV、SRV、SIV 和 STLTV-1 4 种病毒进行连续 4 次的病毒抗体检测,每次间隔时间 2 个月。从 2010 年、2011 年、2012 年、2013 年和 2014 年,每年两次对动物检测 BV、SRV、SIV 和 STLTV-1 4 种病毒,间隔时间为每 6 个月一次【SYXK(滇)2010-0001】。食蟹猴饲养的设施及管理规范已通过国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC International)的完全认证。

1.2 被检血清

静脉采集全血 2 mL,静置 30 min 后离心(3000

r/min × 15 min,室温),分离血清静置于 4℃ 待检,若长期保存,需置于 -40℃ 冰箱冷冻保存。

1.3 检测试剂盒

猴 5 项病毒斑点免疫检测试剂盒均从 VRL Laboratories(USA)购买,实验操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.4 结果判定

根据试剂盒说明判断病毒抗体阳性、可疑和阴性,可疑结果经过 1 个月后重新采样复检予以确认。

2 结果

2.1 引进初始种群时病毒抗体检测结果

对 2009 年从老挝引种的食蟹猴,经连续进行 4 次病毒抗体检测后,结果显示,在 1998 只动物中, BV 抗体阳性食蟹猴总比例高达 52.35%,其中仅 B 病毒抗体阳性的食蟹猴比例为 48.95%,同时检测出 BV 和 SRV 抗体阳性的比例为 1.30%, BV 和 STLTV-1 抗体同时表现阳性的比例为 1.50%,同时检测出 BV、SRV 和 STLTV-1 3 种病毒抗体均为阳性的食蟹猴比例为 0.60%; BV 抗体可疑的比例为 8.31%,而在引进的 1998 只食蟹猴中, BV 抗体检测为阴性的比例仅为 39.34%。在检测的血清样本中, SRV 和 STLTV-1 抗体阳性率分别为 7.45% 和 8.56%。通过血清样本检测,未检测出 SIV 抗体阳性或可疑的动物,具体检测结果见表 1 和图 1。

2.2 BV 抗体动态监测结果

结果显示, BV 抗体阳性食蟹猴数量每年呈逐渐下降的趋势,2010 年 BV 抗体阳性率和可疑率分别为 5.24% 和 1.61%,截至 2014 年年底, BV 抗体阳性率仅为 0.82%, BV 抗体可疑动物比例仅为 0.55%,具体检测结果见表 2。

2.3 SRV 抗体动态监测结果

结果显示, SRV 抗体阳性动物数量从 2010~2014 年每年呈逐渐下降的趋势,2010 年 SRV 抗体阳性的食蟹猴为 5 只,阳性率为 1.01%, SRV 抗体可疑的食蟹猴为 3 只,可疑率为 0.60%,截至 2014 年年底, SRV 抗体阳性的食蟹猴仅为 1 只, SRV 抗体可疑食蟹猴也仅有 1 只,具体检测结果见表 3。

2.4 STLV-1 抗体动态监测结果

结果显示,STLV-1 抗体阳性动物数量从 2010 ~ 2014 年的变化趋势不明显,2010 年 STLV-1 抗体阳性的食蟹猴有 2 只,而 2014 年 STLV-1 抗体阳性的食蟹猴仍然有 1 只。具体检测结果见表 4。

表 1 引进初始种群时病毒抗体检测结果

Tab.1 Results of virus antibody test of the introduced initial monkey population

病毒种类 Types of virus	阳性动物数/只 Positive animals/n	阳性率/% Positive rate/%	可疑动物数/只 Suspicious animals/n	可疑率/% Suspicion rate/%
BV	978	48.95	166	8.31
SRV	90	4.50	34	1.70
SIV	0	0.00	0	0.00
STLV-1	108	5.41	31	1.55
BV + SRV	26	1.30	0	0.00
BV + STLV-1	30	1.50	0	0.00
SRV + STLV-1	21	1.05	0	0.00
BV + SRV + STLV-1	12	0.60	0	0.00

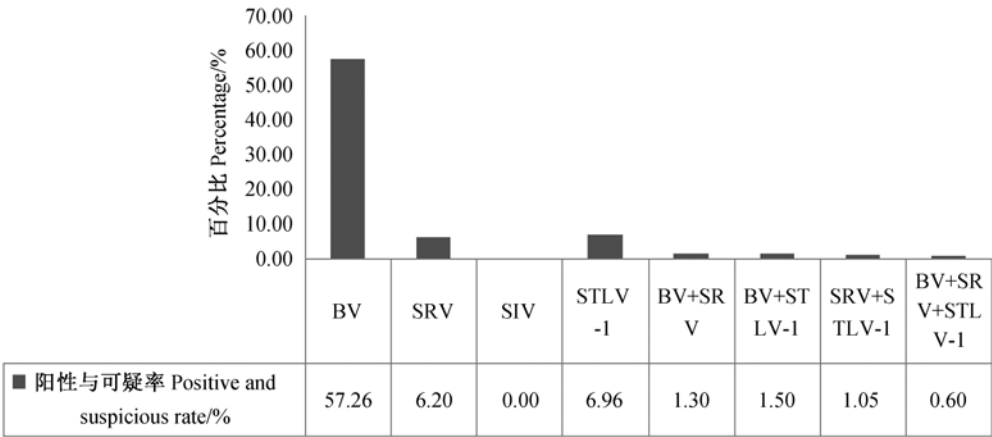


图 1 引进初始种群时病毒抗体阳性与可疑率

Fig.1 Positive and suspicion rate of virus antibody of the introduced initial monkey population

表 2 BV 抗体动态监测结果

Tab.2 Results of dynamic monitoring of BV antibody

年度 Years	动物总数/只 Total animal number/n	阳性动物数/只 Positive animals/n	阳性率/% Positive rate/%	可疑动物数/只 Suspicious animals/n	可疑率/% Suspicion rate/%	死亡及淘汰动物数/只 Death and obsolete animals/n
2010	496	26	5.24	8	1.61	16
2011	446	18	4.04	7	1.57	13
2012	408	11	2.70	4	0.98	11
2013	382	5	1.31	3	0.79	9
2014	365	3	0.82	2	0.55	9

表 3 SRV 抗体动态监测结果

Tab.3 Results of dynamic monitoring of SRV antibody

年度 Years	动物总数/只 Total animal number/n	阳性动物数/只 Positive animals/n	阳性率/% Positive rate/%	可疑动物数/只 Suspicious animals/n	可疑率/% Suspicion rate/%	死亡及淘汰动物数/只 Death and obsolete animals/n
2010	496	5	1.01	3	0.60	16
2011	446	3	0.67	2	0.45	13
2012	408	2	0.49	2	0.49	11
2013	382	2	0.52	1	0.26	9
2014	365	1	0.27	1	0.27	9

表 4 STLV-1 抗体动态监测结果

Tab. 4 Results of dynamic monitoring of STLV-1 antibody

年度 Years	动物总数/只 Total animal number/n	阳性动物数/只 Positive animals/n	阳性率/% Positive rate/%	可疑动物数/只 Suspicious animals/n	可疑率/% Suspicion rate/%	死亡及淘汰动物数/只 Death and obsolete animals/n
2010	496	2	0.40	1	0.20	16
2011	446	2	0.45	2	0.45	13
2012	408	1	0.25	1	0.25	11
2013	382	1	0.26	2	0.52	9
2014	365	1	0.27	1	0.27	9

2.5 SIV 抗体动态监测结果

从 2009 年引种至 2014 年年底,每年均按程序对食蟹猴进行 SIV 抗体监测,结果显示,均未检测出 SIV 抗体阳性或可疑的食蟹猴。

2.6 SPF 种群与普通种群自繁幼猴病毒抗体比较

从 2009 年初步建立 SPF 种群后,于 2012 年开始配种繁殖,根据 2012 年、2013 年和 2014 年的繁殖情况分析,普通种群共繁殖 865 只幼猴,SPF 种群共繁殖 462 只幼猴,幼猴断奶时间为 5~8 个月,幼

猴断奶时采集血样并对病毒抗体进行检测。病毒抗体检测结果表明,普通种群繁殖的幼猴中,BV 抗体阳性的幼年食蟹猴共 84 只,阳性率为 9.71%,BV 抗体可疑动物 16 只,可疑率为 1.85%;而检测 SPF 繁殖种群的 462 只幼猴发现只有 1 只幼猴检测 BV 抗体表现阳性,阳性率仅为 0.22%,未发现 BV 抗体可疑的动物。同时对 SPF 种群与普通种群自繁幼猴病毒检测中均未发现 SRV、SIV、STLV-1 抗体阳性或可疑的动物,结果见表 5。

表 5 SPF 种群与普通种群幼猴病毒抗体比较

Tab. 5 Comparison of virus antibody in the baby monkeys of the common and SPF populations

种群 Populations	幼猴数/只 Baby monkeys/n	阳性动物数/只 Positive animals/n	阳性率/% Positive rate/%	可疑动物数/只 Suspicious animals/n	可疑率/% Suspicion rate/%
普通动物繁殖群 Common breeding population	865	84	9.71	16	1.85
SPF 动物繁殖群 SPF breeding population	462	1	0.22	0	0.00

3 讨论

本研究涉及食蟹猴数量较多,时间跨度大,年龄段较为集中,从最初组建 SPF 种群的检测结果来看,BV 抗体阴性的食蟹猴比例仅为 39.34%,抗体可疑的比例为 8.31%,而 BV 抗体阳性率高达 52.35%,略高于赵国明等^[3]调查显示来自广西各野生动物保护区食蟹猴 B 病毒相关抗体阳性率 49.8%,但低于韦毅等^[4]报道的野外捕获混养食蟹猴 B 病毒 83.4% 的阳性率,数据表明 BV 在食蟹猴养殖中普遍存在且病毒抗体阳性率高。

对 2009 年引种的食蟹猴进行连续 4 次检测统计,SRV 和 STLV-1 抗体阳性率分别为 7.45% 和 8.56%,SRV 和 STLV-1 抗体阳性率分别高于杨净思等^[5]报道的恒河猴 SRV 和 STLV-1 的抗体阳性率(分别为 5.36% 和 5.95%),也高于饶军华等^[6]报道食蟹猴的 STLV-1 抗体 5.4% 的阳性率,但低于周亚敏等^[7]报道食蟹猴 STLV-1 抗体 14.9% 的阳性率及 SRV 抗体 18.1% 的阳性率,经过筛选后组建的

SPF 种群,在 2010 年检测的 BV、SRV 和 STLV-1 抗体阳性率分别为 5.24%、1.01% 和 0.4%,经过连续 5 年的不断筛选和淘汰,BV、SRV 和 STLV-1 抗体阳性率在 2014 年年底分别下降至 0.82%、0.27% 和 0.27%,说明连续监测病毒抗体并不断淘汰抗体阳性和可疑的动物对组建 SPF 食蟹猴种群具有重要意义。

通过对 SPF 种群与普通种群自繁幼猴病毒抗体比较分析发现,普通种群繁殖的幼猴中,BV 抗体阳性的幼年食蟹猴共 84 只,阳性率为 9.71%,可疑率为 1.85%,其中原因可能与幼猴从出生到离乳期间,生存的环境中都是 BV 抗体阳性或可疑猴,增加了感染机率;而检测 SPF 繁殖种群的 462 只幼猴发现只有 1 只幼猴检测 BV 抗体表现阳性,阳性率仅为 0.22%,未发现 BV 抗体可疑的动物,说明了在 SPF 食蟹猴种群的建立过程中,定期对动物病毒进行监测,隔离阳性和可疑的动物,对提高食蟹猴的质量具有重要意义,同时也表明了 SPF 种群建立对生产 SPF 幼猴具有显著的意义。

李常挺等^[8]报道过野生猕猴 SIV 抗体全部呈阴性,本文通过对食蟹猴 SIV 抗体的连续监测,也均未发现 SIV 抗体阳性或可疑的食蟹猴,提示从老挝引种的食蟹猴不携带 SIV。

通过对老挝引种的食蟹猴病毒抗体的监测结果提示,我国在引进食蟹猴时,应该注意:(1)重视加强对食蟹猴 BV、SRV、STLV-1 抗体的监测;(2)通过数据显示,应尽量引进年幼的动物,这与刘欢等^[9]的研究结果一致。

现有的研究结果普遍认为灵长类动物病毒的主要传播途径包括打斗、撕咬、性交等,母猴垂直传播给仔猴几率极低^[10,11],同时韦秋奖^[12]对 137 份 B 病毒阴性群自繁 1 岁以上的幼猴血清进行检测,没有发现 B 病毒抗体呈阳性。因此在灵长类动物日常饲养过程中,除了加大对阳性和可疑动物监测和淘汰力度外,必须加强防御措施,包括饲养环境的标准化、不断完善检疫制度以及人员的管理等。首先,引进灵长类动物时,必须隔离检疫,检测合格后方可进入饲养区;其次,按饲养目的的不同,采取分群饲养管理,加强对食物和饲养环境的消毒,发现阳性和可疑动物严格隔离处理。第三,建立完善的检疫制度,定期对整个猴群进行病毒抗体的检测,严格淘汰阳性和可疑动物,逐渐建立 SPF 种群。

参 考 文 献

- [1] 魏振年. 猕猴的生殖生理及科研应用 [J]. 动物学杂志, 1988, 23(6): 46-50.
- [2] 林昆华. 灵长类动物疾病学 [M]. 北京:农业大学出版社, 1994, 231-232.
- [3] 赵国明, 麻秀珍, 王弘义, 等. 广西食蟹猴 B 病毒感染情况调查 [J]. 中国检验检疫, 1997, 14(5): 26-27.
- [4] 韦毅, 刘自民, 黄广宾, 等. 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) B 病毒相关抗体的初步探讨 [J]. 广西科学, 1996, 3(1): 74-76.
- [5] 杨净思, 张丽旌, 李晓燕, 等. 恒河猴 SRV-1 和 STLV-1 血清抗体流行病学研究 [C]. 第十次全国生物制品学术会议, 2009, 311-314.
- [6] 饶军华, 刘晓明, 金石军, 等. 猕猴、食蟹猴群中 STLV-1 病毒感染状况的研究 [J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(4): 25-26.
- [7] 周亚敏, 李绍东, 段幸生. 食蟹猴 (*Macaca Fascicularis*) 血清中三种逆转录病毒抗体调查 [J]. 中国比较医学杂志, 1997, 02: 73-74.
- [8] 李常挺, 盘宝进, 谢永平, 等. 从野生猕猴检测出 STLV-1 和 B 病毒抗体 [C]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会第三次学术研讨会论文集, 2012.
- [9] 刘欢, 张伟, 李晓平, 等. 马来西亚食蟹猴 B 病毒相关抗体检查 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 60-62.
- [10] 田克恭. 实验动物病毒性疾病 [M]. 北京:农业出版社, 1992:402.
- [11] 饶军华, 刘晓明, 田克恭, 等. 猕猴 SPF 种群的建立及保持过程中 B 病毒抗体监测研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(5): 294-296.
- [12] 韦秋奖. 自繁幼猴感染 B 病毒情况调查 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 53-55.

[收稿日期] 2015-07-23